

ШУРХНО РАВИЛЯ АБДУЛЛОВНА

**ФЕРМЕНТАЦИЯ ВЫСОКОБЕЛКОВОЙ РАСТИТЕЛЬНОЙ МАССЫ С
ИНТРОДУКЦИЕЙ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

КАЗАНЬ – 2004

Работа выполнена в лаборатории сельскохозяйственной микробиологии Государственного научного учреждения Татарского научно-исследовательского института сельского хозяйства РАСХН

Научный руководитель

доктор биологических наук,
профессор Р.П. Наумова

Научный консультант

доктор сельскохозяйственных наук,
член-корр. АН РТ Р.Г. Гареев

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор Чиков В.И.,
доктор биологических наук,
Селивановская С.Ю.

Ведущая организация:

Всероссийский научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной
микробиологии РАСХН, Санкт-Петербург

Защита состоится «_____» _____ 2004 г. в _____ часов на заседании Диссертационного Совета Д.212.081.13 при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина», 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного университета

Автореферат разослан _____ 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного Совета,
кандидат биологических наук

А.Н. Аскарова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Силосование следует рассматривать как приоритетный способ консервирования растительной массы, так как его основным преимуществом является сохранение питательности и биологических свойств зеленых растений, повышение энергетической ценности готового корма в сравнении с исходным материалом (Квасников и др., 1975; McDonald et al., 1991). Среди качественных и доступных кормов силос отличается низкой себестоимостью (Зубрилин, 1964; Чуканов и др., 1986).

Биохимический смысл силосования кормовых культур заключается в том, что в результате частичной потери питательных веществ, главным образом сахаров, и превращения некоторых из них в органические низкомолекулярные кислоты сохраняются остальные компоненты исходной растительной массы, особенно кормовой белок (Таранов и др., 1987). Использование белка растительного происхождения в кормопроизводстве снижает его дефицит в рационах, чем определяется роль бобовых культур, в которых содержание белка в 1,5–3 раза выше, чем в злаковых. Кроме того, белок бобовых трав более полноценен по аминокислотному составу и содержит больше незаменимых аминокислот (Жеруков и др., 2003).

Ведущее положение среди традиционных кормовых культур занимают высокобелковые травы: клевер луговой, люцерна посевная, некоторые сорта эспарцета и других бобовых растений (Бондарев, 2003). В число реально используемых в практике кормопроизводства в республике Татарстан, кроме разных сортов клевера лугового (Зарипова и др., 1999), входит новая перспективная бобовая культура – козлятник восточный. По кормовым достоинствам он не уступает клеверу и люцерне, значительно превосходя их по продуктивному долголетию и скорости весеннего отрастания. Имеющийся опыт интродукции козлятника восточного в некоторых регионах страны свидетельствует о высокой биологической пластичности и больших потенциальных возможностях данной культуры (Жеруков и др., 2003).

В российских климатических условиях заготовка качественного силоса во многом может решить проблему дефицита кормов. По статистике, хозяйства России ежегодно теряют до 30% консервированных кормов из-за несоблюдения технологии их приготовления (Лаптев и др., 2002). Более того, за последние десять лет общий уровень производства кормов в России снизился на 105 т кормовых единиц и качественный состав их значительно ухудшился. В этой связи актуальны исследования, направленные на поиск и выделение из различных экологических ниш молочнокислых бактерий для повышения эффективности ферментации высокобелковых культур и получения качественного продукта.

Одно из перспективных направлений интенсификации силосования и повышения качества кормов основано на применении индивидуальных штаммов или ассоциаций молочнокислых бактерий (Зубрилин, 1964; Квасников и др., 1975; Чуканов и др., 1986; McDonald et al., 1991).

При инокуляции *L. plantarum* райграса итальянского и ежи сборной получали хорошо сохранившийся силос с высоким содержанием молочной кислоты. Этот прием оказывал благоприятное влияние также на предотвращение брожения

кlostридиального типа (McDonald et al., 1991; Cai et al., 1999; Nadeau et al., 2000; Winters et al., 2000).

Цель и задачи исследований. Цель настоящей работы – выделить из фило– и ризосферы культивируемых в Татарстане бобовых трав и образцов силоса активные штаммы молочнокислых бактерий и охарактеризовать их физиолого–биохимический потенциал с точки зрения возможности использования этих бактерий для сбраживания трудносилосуемых растений: клевера лугового (*Trifolium pratense*) и козлятника восточного (*Galega orientalis*).

Были поставлены следующие задачи:

1. Охарактеризовать фило– и ризосферу бобовых трав как природное местообитание молочнокислых бактерий в сопоставлении с распределением основных физиологических групп микроорганизмов.

2. Выделить из различных источников местные штаммы молочнокислых бактерий с повышенной биохимической активностью в отношении сбраживания высокобелковых культур.

3. Оценить в условиях модельного опыта физиолого–биохимический потенциал изолятов молочнокислых бактерий с точки зрения возможности их интродукции для повышения эффективности сбраживания растительных субстратов.

4. Осуществить экспериментальное силосование с использованием наиболее активных местных штаммов молочнокислых бактерий и оценить эффективность ферментации и динамику этого процесса на основе мониторинга с использованием основных микробиологических и биохимических параметров, а также оценить качество кормового продукта.

Научная новизна работы. Фило– и ризосфера бобовых культур – традиционной для Татарстана (клевера лугового) и новой (козлятника восточного) охарактеризована с точки зрения количественного распределения молочнокислых бактерий на фоне основных физиологических групп микроорганизмов: аэробных гетеротрофных бактерий, дрожжей, микроскопических грибов, аммонифицирующих бактерий и бактерий группы кишечной палочки. На основе скрининга природных биоценозов фило– и ризосферы бобовых трав осуществлено выделение и сравнительное изучение широкого спектра местных штаммов молочнокислых бактерий (более 40 изолятов), что позволило провести отбор штаммов с повышенной биохимической активностью и технологически важными свойствами.

Впервые на примере системы с использованием растительных соков бобовых трав продемонстрирована принципиальная возможность моделирования их молочнокислого сбраживания в регламентируемых условиях лабораторного эксперимента.

Экспериментальное силосование высокобелковых бобовых трав – клевера лугового и козлятника восточного в полупроизводственных условиях с инокуляцией силосуемой массы наиболее активными из выделенных лактобацилл выявило преимущества этого процесса с его направленной регуляцией популяционной структуры микрофлоры – как с точки зрения активизации брожения, так и качества кормового продукта. Работа выявила интересный феномен активизации продукции каротиноидов при силосовании с интродукцией активных местных штаммов молочнокислых бактерий.

Практическое значение работы. Главный практический аспект данной работы связан с решением проблем увеличения масштабов заготовки кормов для животноводства и улучшения его качества, а именно повышения эффективности молочнокислого сбраживания трудносилосуемых бобовых трав, культивируемых в Татарстане. Проведенное исследование состояния микрофлоры ризосферы в условиях трехлетнего культивирования многолетних бобовых трав свидетельствует о положительном воздействии данного приема как с точки зрения состава и численности основных физиолого-таксономических групп микроорганизмов, так и с позиций влияния возделывания данных культур на восстановление плодородия почвы и снижение ее утомляемости.

Создана коллекция молочнокислых бактерий из рода *Lactobacillus*, ассоциированных с культивируемыми бобовыми травами Татарстана. В качестве ключевых критериев для создания такой коллекции были использованы соотношение продуцируемой молочной кислоты и гомологов жирных кислот, темпы ацидогенеза, осмолотерантность и протеолитическая активность.

Обоснованные в работе приемы создания специализированного банка местных штаммов молочнокислых бактерий с адекватными физиолого-биохимическими и технологическими свойствами могут служить методической базой для решения подобных проблем применительно к консервированию других растительных ресурсов и к другим регионам. Для этой же цели результаты работы позволяют рекомендовать моделирование сбраживания растительных соков растений, которое дает возможность одновременного сопоставления как интересующих исследователей наборов штаммов, так и испытываемых растений, сокращая трудоемкий процесс опытного силосования с сезонной привязкой.

С использованием наиболее активных местных штаммов молочнокислых бактерий осуществлено опытное силосование бобовых растений – клевера лугового и козлятника восточного, которое продемонстрировало эффективность направленной инокуляции растительного сырья с точки зрения динамики процесса (структуры микрофлоры, pH, продуктов брожения) и общих показателей качества полученного кормового продукта. Результаты работы позволили рекомендовать клевер луговой в качестве основной силосуемой культуры.

Апробация работы. Основные результаты диссертации представлены на: V и VIII Пущинских конференциях молодых ученых «Биология – наука 21 века» (Пущино, 2001, 2004); всероссийской научно-практической конференции «Агро-экологические проблемы сельскохозяйственного производства в условиях техногенного загрязнения агроэкосистем» (Казань, 2001); международной конференции «Роль почвы в формировании естественных и антропогенных ландшафтов» (Казань, 2003). Основные результаты диссертации обсуждены на ежегодных отчетах методической комиссии ГНУ Татарского НИИСХ (Казань, 2000–2004).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 статей, 4 тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертация включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, изложение результатов исследования и их обсуждение, выводы и перечень цитируемой литературы. Работа изложена на 110 страницах машинописного текста, включает 9 таблиц и 20 рисунков. Цитируемая литература включает 126 источников, из них 72 иностранных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Объекты исследования: серая лесная почва с опытных участков лаборатории многолетних трав; образцы фило–ризосферы и силосов; растительный сок.

2. Микроорганизмы, методы их культивирования и количественного учета. В работе использовали молочнокислые бактерии, выделенные из надземной части вегетирующих бобовых растений (RS1, RS3, RS4), их ризосферы (RS5), растительных соков (RS6, RS7) и силосов (RS2) методом глубинного посева соответствующих разведений на агаризованную среду Рогозы (рН 5,5) (Rogosa et al., 1951) и культивировали при 37°C в стационарных условиях. В работе использовали коллекционный штамм–*Lactobacillus plantarum* BS933 из ИБФМ РАН (Kozlova et al., 1999) и *Streptococcus faecium* 500–коммерческий штамм ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии.

Молочнокислые бактерии выявляли на селективной среде Рогозы (Rogosa et al., 1951), рифампицин–устойчивые (МКБ–rif) штаммы молочнокислых бактерий получали путем поверхностного посева 18ч культур молочнокислых бактерий на MRS–агар (Man et al., 1960) с содержанием рифампицина 10, 25, 50, 75, 100 мкг/мл и культивировали при 37°C. Отдельные колонии пересевали в жидкую среду MRS с той же дозой антибиотика и инкубировали аналогично, с последующим посевом на MRS–агар. Численность МКБ–rif в процессе ферментации растительной массы выявляли на агаризованной среде Рогозы с добавлением рифампицина (100 мкл/мл).

Аэробные гетеротрофы выявляли на мясо-пептонном агаре, актиномицеты учитывали на крахмало–аммиачном агаре, подсчет аммонифицирующих бактерий осуществляли на агаризованной смеси мясо-пептонного бульона и неохмеленного пивного сусла (3° по Баллингу) (1:1), микроскопические грибы культивировали на среде Чапека-Докса, бактерии группы кишечной палочки идентифицировали на среде Эндо, нитрифицирующие бактерии культивировали на голодном агаре, свободноживущих азотфиксаторов учитывали на среде Эшби, дрожжи выращивали на среде Сабуро. Численность микроорганизмов выражали в количестве колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1г воздушносухого субстрата (почва, силос) после ее высушивания при 105°C (Методы ..., 1991; Теппер и др., 1993; Егоров, 1995; Зенова и др., 2002).

3. Определение биологических активностей: протеолитическую активность определяли в культуральной жидкости (рост на MRS, стационарная фаза) по гидролизу казеина (Каверзнева, 1971); сравнительную оценку осмотолерантности экспериментальных штаммов проводили культивированием на агаризованной среде Рогозы с добавлением NaCl в интервале от 0,5 до 1М или глюкозы – от 0,1–1,7М и инкубировали при 37°C в стационарных условиях.

4. Сбраживание растительных соков проводили в пробирке с 10мл сока козлятника, клевера и люцерны вносили 18 часовые инокулюмы с экспериментальными штаммами молочнокислых бактерий (девять монокультур) объемом 0,1мл с титром $1,0\text{--}1,1 \cdot 10^6$ клеток/мл (Пименова и др., 1971). Количество молочнокислых бактерий в процессе сбраживания сока определяли непосредственно

после асептического отбора образцов в начале эксперимента и через 3, 10, 20, 30 и 45 суток при комнатной температуре, имитируя производственные условия.

5. Опытное силосование в полупроизводственных условиях

- Для инокуляции проявленной растительной массы использовали суточные штаммы молочнокислых бактерий: *Lactobacillus sp. RS3*; *Lactobacillus sp. RS4*; *Lactobacillus plantarum BS933* и *Streptococcus faecium 500*. Интродукцию проводили асептически, распределяя клеточную суспензию (10^6 кл/мл) в 1 кг растительной массы.
- Сухое вещество силоса определяли высушиванием при 108°C (ГОСТ 13496.3–80).
- Оценку питательности по содержанию обменной энергии (расчетным путем) проводили на основе данных о содержании перевариваемых питательных веществ (Петухова и др., 1989).
- Общий азот определяли (по Кьельдалю) по ГОСТу 50466–92, сахар по ГОСТу 26176–91.
- Содержание каротина в кормах определяли по интенсивности желтого окрашивания их органических экстрактов при длине волны 440 нм (спектрофотометрически). Спектрофотометрические измерения проводили на приборе Lambda 35 (Perkin Elmer, USA).

6. Химические методы

Определение pH (почвы, растительного сока и силоса) проводили на приборе 744 pH Meter Metrohm (Switzerland).

Углеводный состав растительного сока анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Series-200 (PerkinElmer, USA), оснащенном колонкой (300 × 7,8 мм) и детектором (refractive index detector). Для элюции использовали воду особой чистоты (системы Millipore, Direct-Q). Скорость мобильной фазы – 0,5 мл/мин, температура – 80°C. Подготовку проб проводили с использованием картриджей SerPak C–18 фирмы TESSEK Ltd. Prague (Республика Чехия), заполненных сорбентом Searon марки SGX-C18 (зерно 60 мкм, диаметр пор 80 Å).

Органические кислоты определяли с использованием ВЭЖХ. Колонка (250 × 4,6 мм) с детектором (refractive index detector). Элюцию проводили 0,1% H_3PO_4 . Скорость элюента – 0,6 мл/мин, температура – 30°C. Пробоподготовку осуществляли с помощью картриджей SerPak C–18.

Витамины А и Е определяли методом омыления проб щелочью, экстракции и отделения неомыляемой части липидов. Разделение витаминов А и Е и количественное определение проводили с помощью ВЭЖХ обращено-фазной колонкой (4,6 × 83 мм, PE Reduced-Activity 3 μm C18) детекторами длин волн (канал А–324 нм, канал В–294 нм) – диодноматричным и (E_x –365 нм, E_m –510 нм) – флуориметрическим. Элюцию проводили системой растворителей метанол–вода (98:2). Скорость растворителя 1 мл/мин, t комнатная. Время удерживания ретинола (витамина А) 2,5 мин, токоферола (витамина Е) – 5,9 мин (Скурихин и др., 1996).

7. Статистическая обработка результатов

В работе использовали методы математической статистики (Плохинский, 1970; Лакин, 1990) и программное обеспечение Excel XP / 2002. При описании и сравнении количественных признаков, характеризующихся нормальным распределением, применили стандартный набор параметров: среднее арифметическое, дисперсия, квадратичное отклонение, стандартная ошибка среднего арифметического.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Силосование является предпочтительным способом консервирования растительной массы, так как его основным преимуществом является сохранение питательности и биологических свойств зеленых растений, повышение энергетической ценности готового корма в сравнении с исходным материалом (Квасников и др., 1975; McDonald et al., 1991). Среди качественных и доступных кормов силос отличается низкой себестоимостью (Зубрилин, 1964; Чуканов и др., 1986).

Биохимический смысл силосования кормовых культур заключается в том, что в результате частичной потери питательных веществ, главным образом сахаров, и превращения некоторых из них в органические низкомолекулярные кислоты сохраняются остальные компоненты исходной растительной массы, особенно кормовой белок (Таранов и др., 1987). Использование белка растительного происхождения в кормопроизводстве снижает его дефицит в рационах, чем определяется роль бобовых культур, в которых содержание белка в 1,5–3 раза выше, чем в злаковых. Кроме того, белок бобовых трав более полноценен по аминокислотному составу и содержит больше незаменимых аминокислот (Жеруков и др., 2003).

Ведущее положение среди традиционных кормовых культур занимают высокобелковые травы: клевер луговой, люцерна посевная, некоторые сорта эспарцета и других бобовых растений (Бондарев, 2003). В число реально используемых в практике кормопроизводства в республике Татарстан, кроме разных сортов клевера лугового (Зарипова и др., 1999), входит новая перспективная бобовая культура – козлятник восточный. По кормовым достоинствам он не уступает клеверу и люцерне, значительно превосходя их по продуктивному долголетию и скорости весеннего отрастания. Имеющийся опыт интродукции козлятника восточного в некоторых регионах страны свидетельствует о высокой биологической пластичности и больших потенциальных возможностях данной культуры (Жеруков и др., 2003).

Одно из перспективных направлений интенсификации силосования и повышения качества кормов основано на применении индивидуальных штаммов или ассоциаций молочнокислых бактерий (Зубрилин, 1964; Квасников и др., 1975; Чуканов и др., 1986; McDonald et al., 1991). Этой проблеме посвящены, в частности, работы последних лет по инокуляции силосуемых фуражных культур штаммами *Lactobacillus spp.* (Cai et al., 1998), *Pediococcus acidilactici* (Cai et al., 1999), по молочнокислому сбраживанию райграса с интродукцией *L. plantarum* и *L. paracasei* (Winters et al., 2000). Вместе с тем, аналогичные исследования бобовых культур, трудносилосуемых, но весьма перспективных, имеют пока лишь фрагментарный характер (Nadeau et al., 2000).

1. Микрофлора фило– и ризо- сферы многолетних бобовых трав.

В соответствии с целью данной работы, фило– и ризосфера изучаемых бобовых культур охарактеризована как среда обитания молочнокислых бактерий на фоне количественного распределения основных физиолого–биохимических групп микроорганизмов: аэробных гетеротрофов, аммонифицирующих бактерий, дрожжей, бактерий группы кишечной палочки и микромицетов. Молочнокислые бактерии не принадлежали к числу мажорных групп в составе микрофлоры фило– и ризосферы. Их численность далеко уступала таковой аэробных гетеротрофов (на 2–4 порядка), что согласуется с данными предшествующих работ (Квасников и др., 1975; Koch et al., 1973; Lin et al., 1992b). Так, (Pahlow et al., 1990) молочнокислая микрофлора (группы: *lactococci*, *pediococci* и *leuconostoc*) составила около 5% от общих эпифитных популяций люцерны.

В свою очередь, содержание молочнокислых бактерий в прикорневой зоне изучаемых нами бобовых растений почти на 2 порядка меньше, по сравнению с эпифитной микрофлорой. Максимальная численность молочнокислых бактерий в ризосфере клевера и люцерны приходилась на июнь, козлятника – на июль месяцы.

2. Характеристика местных изолятов молочнокислых бактерий.

Направленный скрининг, охватывающий надземную часть бобовых растений и их ризосферу, позволил получить 15 изолятов бактерий с характерными свойствами возбудителей молочнокислого брожения, на базе которых осуществлен первичный отбор с учетом: типа брожения (предпочтительно гомоферментативного), скорости и масштабов ацидогенеза. Семь изолятов, темпы и уровень кислотообразования, которых были подтверждены ВЭЖХ анализом органических кислот (табл.1), по результатам дифференциально-диагностического тестирования (Kandler et al., 1986; Kozaki et al., 1992; Axelsson, 1998), отнесены к семейству *Lactobacillaceae*, роду *Lactobacillus*: *Lactobacillus sp. RS1* из филосферы лядвенца рогатого, *Lactobacillus sp. RS2* из кукурузного силоса, *Lactobacillus sp. RS3* из филосферы люцерны посевной, *Lactobacillus sp. RS4* из филосферы клевера лугового, *Lactobacillus sp. RS5* из ризосферы лядвенца рогатого, *Lactobacillus sp. RS6* из сока клевера лугового, *Lactobacillus sp. RS7* из сока люцерны посевной.

Таблица 1.

ВЭЖХ анализ органических кислот

Свойства	Штаммы						
	<i>RS1</i>	<i>RS2</i>	<i>RS3</i>	<i>RS4</i>	<i>RS5</i>	<i>RS6</i>	<i>RS7</i>
лактат, г/мл	15,1	11,1	18,3	14,4	12,4	11,1	12,9
ацетат, мг/мл	0,8	1,2	3,0	1,6	1,4	0,9	1,3

В отличие от пищевых технологий, таких как квашение овощей, микроорганизмы в процессе силосования, как правило, не подвергаются солевому стрессу. Тем не менее, осмонапряженность силосного сока может быть обусловлена в основном сконцентрированными при проявлении компонентами клеточного сока и низкомолекулярными продуктами гидролиза растительных полимеров. В этой связи оценка осмоотолерантности силосной микрофлоры представляла интерес, тем более что резистентность к повышенной осмоляльности среды может коррелировать с такими проявлениями экстремотолерантности как устойчивость к по-

вышенной кислотности, токсическим формам кислорода, резким перепадам температур (Van de Guchte et al., 2002).

Все лактобациллы проявили умеренную солеустойчивость, так как рост их, кроме наименее устойчивого *Lactobacillus sp.RS6*, совместим с 0,5М NaCl, а повышение концентрации до 1М предотвращало рост всех испытуемых штаммов. Отношение к возрастающим концентрациям глюкозы было более дифференцированным: наиболее толерантны штаммы *Lactobacillus sp.RS2* и *Lactobacillus sp.RS3*, способные расти при всех испытанных концентрациях, включая 1,7М. Данная максимальная доза подавляла рост четырех штаммов, устойчивых к концентрациям до 1,1М (*Lactobacillus sp.RS4*, *Lactobacillus sp.RS5*, *Lactobacillus sp.RS6*, *Lactobacillus sp.RS7*). Наконец, рост *Lactobacillus sp.RS1* совместим только с наименьшей концентрацией глюкозы (0,1М). Коллекционный штамм *L. plantarum BS933* сходен по данному признаку со штаммами *Lactobacillus sp.RS2* и *Lactobacillus sp.RS3*, тогда как коммерческий штамм *St. faecium 500* был наименее осмоотолерантен (табл.2).

Таблица 2.

Сравнительная оценка осмоотолерантности молочнокислых бактерий

Штаммы	Рост в присутствии:						
	NaCl		глюкозы				
	0,5М	1М	0,1М	0,3М	0,5М	1,1М	1,7М
<i>Lactobacillus sp.RS1</i>	+	—	+	—	—	—	—
<i>Lactobacillus sp.RS2</i>	+	—	+	+	+	+	±
<i>Lactobacillus sp.RS3</i>	+	—	+	+	+	+	±
<i>Lactobacillus sp.RS4</i>	+	—	+	+	+	+	—
<i>Lactobacillus sp.RS5</i>	+	—	+	+	+	+	—
<i>Lactobacillus sp.RS6</i>	—	—	+	+	+	+	—
<i>Lactobacillus sp.RS7</i>	+	—	+	+	+	+	—
<i>L. plantarum BS933</i>	+	—	+	+	+	+	—
<i>St.faecium 500</i>	+	—	+	—	—	—	—

+, активный рост; —, отсутствие роста; ±, слабый рост.

В работах (Cai et al, 1997; 1998; 1999; Glaasker et al., 1998) установлен эффект NaCl-толерантности ряда молочнокислых бактерий (в пределах от 0,2М – 1,3М).

Гидролиз белков происходит на ранних стадиях сбраживания растительной массы (McDonald et al., 1991). В гидролизе протеиновых компонентов и последующем катаболизме олигопептидов и аминокислот участвуют и растительные, и микробные ферменты. Обычно быстрое снижение pH среды лимитирует гидролиз белков в процессе силосования, ингибируя тем самым активность растительных протеиназ и рост сопутствующей микрофлоры (McDonald et al., 1991).

Протеолитическая активность изучаемых нами штаммов молочнокислых бактерий представлена в табл.3. Внеклеточная протеолитическая активность вы-

явлена на уровне 26–44 мкг образованного тирозина/мл*мин у всех изучаемых лактобацилл. В ходе изучения силосования райграса (Winters et al., 2000) показана высокая протеолитическая активность у спонтанных молочнокислых бактерий. В качестве положительного фактора автором отмечается снижение гидролиза белков при инокуляции растительной массы штаммами молочнокислых бактерий (*L. plantarum* и *L. paracasei*) с повышенной кислотообразующей активностью.

Таблица 3.

Протеолитическая активность различных штаммов
молочнокислых бактерий

Штаммы молочнокис- лых бактерий	Протеолитическая активность по казеину (мкг тирозина/мл*мин)			
	16ч	20ч	24ч	40ч
<i>Lactobacillus sp.RS1</i>	0	0	16,8	28
<i>Lactobacillus sp.RS2</i>	0	7,5	8,4	26,1
<i>Lactobacillus sp.RS3</i>	0	20,5	27,1	36,4
<i>Lactobacillus sp.RS4</i>	0	0	11,2	32,7
<i>Lactobacillus sp.RS5</i>	1,9	5,6	15,9	50,4
<i>Lactobacillus sp.RS6</i>	0	11,2	16,8	42,9
<i>Lactobacillus sp.RS7</i>	0	0	20,5	43,9
<i>L. plantarum BS933</i>	0	0	1,9	35,5
<i>St. faecium 500</i>	0	1,9	22,4	61,6

3. Моделирование молочнокислого сбраживания соков бобовых растений.

Информация об адекватности свойств изучаемых штаммов задачам нашей работы получена в модельном эксперименте на базе не растительной массы, а соков бобовых растений – клевера, козлятника, люцерны, которые были подвергнуты молочнокислому сбраживанию в 27 вариантах опыта. Полученная в результате этого возможность сравнительной характеристики широкого круга микробиологических и растительных объектов с точки зрения вышеуказанных параметров продемонстрировала целесообразность данного этапа на пути создания стартовых культур. Таким образом, минуя дорогостоящие масштабированные опыты по силосованию в производственных и полупроизводственных условиях, мы создали базу предварительных данных, которая в нашем случае позволила выбрать штаммы и силосуемые растения для дальнейших испытаний.

Активная кислотность среды является важнейшим регулятором микробиологических процессов при силосовании. Для свежего растительного сока значения pH находятся в пределах 5,5 – 6,5 (McDonald et al., 1991). По истечении 45 суток pH среды в сброженном соке козлятника варьировал в пределах от 4,04 до 4,27, в зависимости от штамма, в случае клевера – от 3,89 до 4,59, тогда как в вариантах с люцерной отмечена слабощелочная реакция (pH 8,42 – 8,85) (рис.1). Результаты моделирования молочнокислого брожения на соке люцерны позволили прогнози-

ровать неэффективность корректировки ее силосования путем интродукции активных штаммов, несмотря на достаточно высокий урожай молочнокислых бактерий на этом субстрате. Уровень продукции свободных кислот и тенденция к росту pH (который можно объяснить высокой «буферностью» этой культуры из-за ее высокой белковости и низкого содержания сахаров) свидетельствуют о несиловуемости данной культуры в чистом виде. Известно, что для получения качественного силоса из высокобелковых трудносилосуемых растений существует ряд приемов, таких как добавление мелассы из расчета 1,5–3% от массы силосуемого сырья, внесение сухой сыворотки, для усиления бродильных процессов, добавление кукурузы и зерноотходов (Чуканов и др., 1986; Хохрин, 2002).

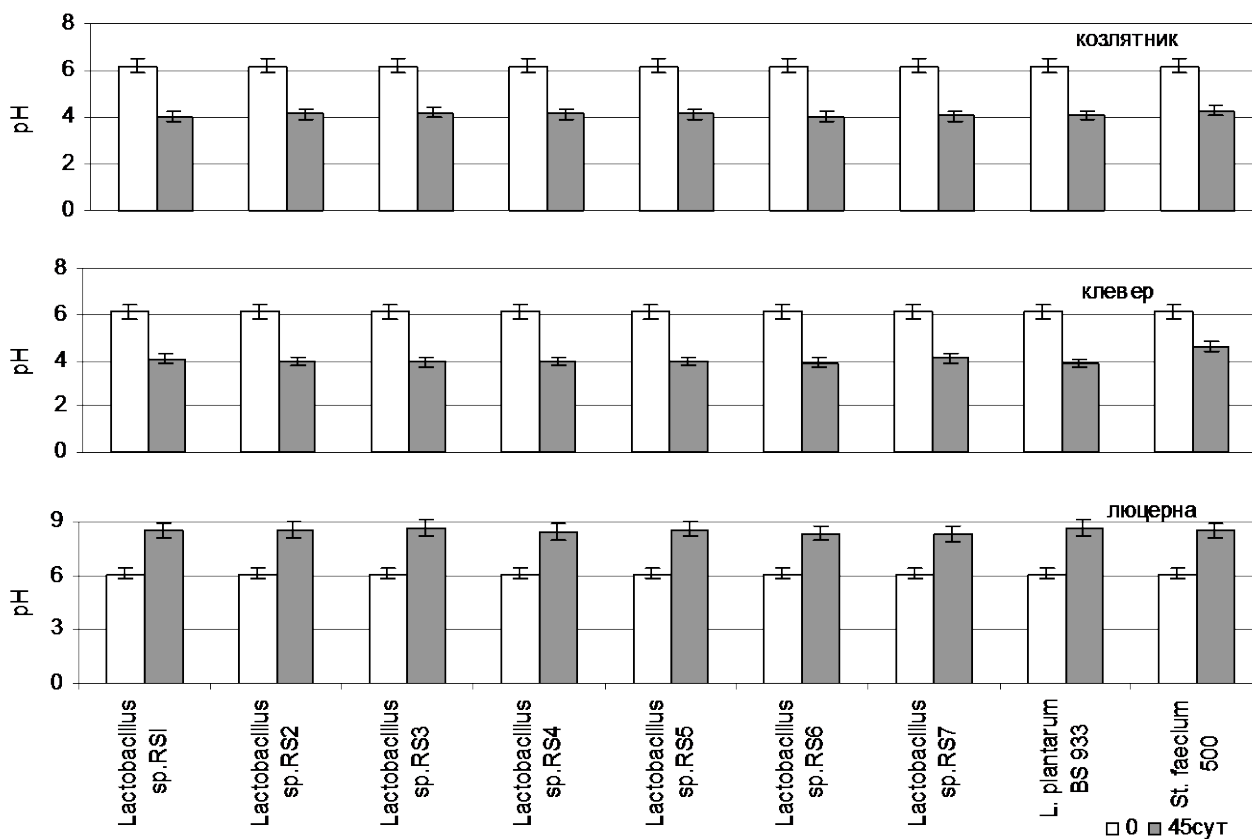


Рис.1. pH в начале и конце процесса ферментации сока различных бобовых трав.

Молочная кислота является главным продуктом молочнокислого брожения. Она обладает диетическими свойствами. Результаты, представленные на рис.2, показывают содержание молочной и уксусной кислот по завершении процесса ферментации сока из козлятника. Наибольшее количество молочной кислоты выявлено в вариантах со штаммами: *Lactobacillus* sp. RS3, *Lactobacillus* sp. RS4, *L. plantarum* BS933 и *Lactobacillus* sp. RS7, где коэффициент соотношения молочной кислоты к уксусной составил 7,5 , 12,3 , 5,1 и 7,9 , соответственно.

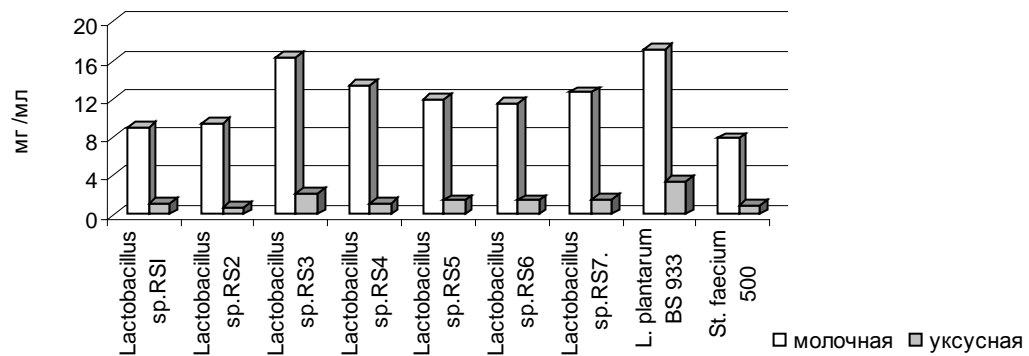


Рис.2. Концентрация органических кислот по завершении ферментации сока козлятника.

В случае клевера (рис.3.) максимальные концентрации молочной кислоты определили в вариантах с интродукцией штаммов *Lactobacillus sp. RS3*, *L. plantarum BS933*, *Lactobacillus sp. RS1*, *Lactobacillus sp. RS4* и *Lactobacillus sp. RS7*, где коэффициент соотношения основных кислот равнялся 6,1 , 8,8 , 18,9 , 9,0 и 9,9, соответственно.

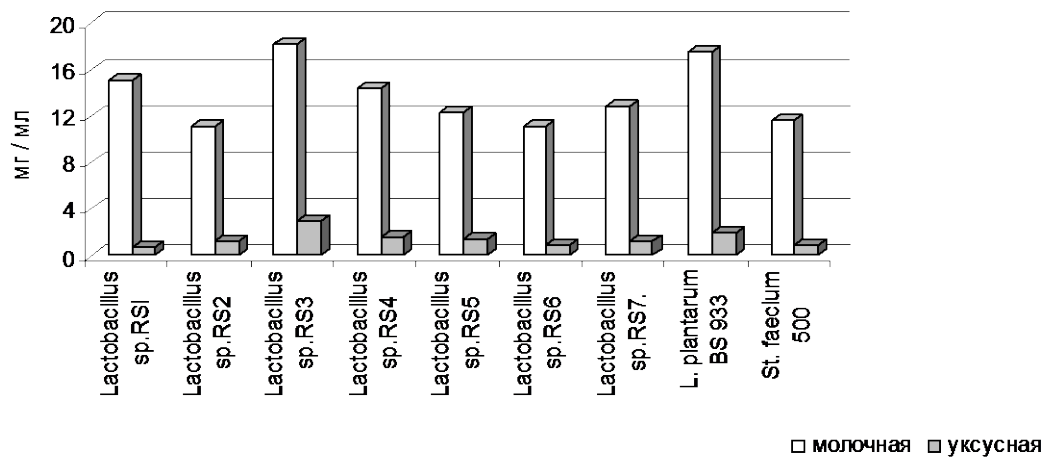


Рис.3. Концентрация органических кислот по завершении ферментации сока клевера.

В модельном опыте с соком люцерны (рис.4) показали прямую зависимость реакции среды (слабощелочная) и количеством органических кислот в сбраживаемом субстрате. Коэффициент соотношения молочной и уксусной кислот варьировал в пределах от 0,9 до 2,8. Вследствие такого отношения двух кислот значение рН среды как выше отмечено – слабощелочная. Соответственно уксуснокислые силоса малоценны по питательности, так как уксусная кислота не доступна как источник энергии для микроорганизмов в рубце животных. Тогда как молочная кислота

быстро метаболизируется главным образом до пропионовой кислоты, которая используется в качестве энергии для роста тканей (Мак–Дональд, 1985; Чуканов и др., 1986).

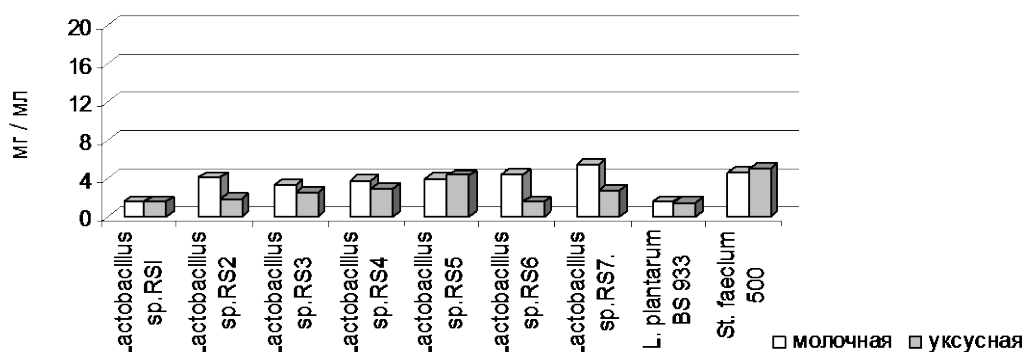


Рис.4. Концентрация органических кислот по завершении ферментации сока люцерны.

Моделирование на растительных соках дало возможность также в регламентированных условиях лабораторного эксперимента оценить влияние инокуляции на содержание витаминов А и Е (табл.4) в сброженных соках. Это содержание, хотя и сравнительно невысокое в абсолютном выражении (порядка 0,32–0,47МЕ витамина А; 0,03–0,16 мкг/мл сока витамина Е) возросло в ходе ферментации в 3,7 – 5,5 раза в вариантах с разными штаммами.

Таблица 4.

Количественное содержание витаминов А и Е в исходных и сброженных растительных соках

Штаммы молочнокислых бактерий	Витамин А		Витамин Е	
	растительный сок	после ферментации	растительный сок	после ферментации
козлятник восточный				
<i>Lactobacillus sp.RS3</i>	0,47 МЕ	2,27 МЕ	0,16 мкг/мл	1,28 мкг/мл
<i>Lactobacillus sp.RS4</i>	0,47 МЕ	0,51 МЕ	0,16 мкг/мл	0,22 мкг/мл
<i>Lactobacillus sp.RS6</i>	0,47 МЕ	0,79 МЕ	0,16 мкг/мл	0,14 мкг/мл
клевер луговой				
<i>Lactobacillus sp.RS3</i>	0,32 МЕ	1,28 МЕ	0,03 мкг/мл	0,8 мкг/мл
<i>Lactobacillus sp.RS4</i>	0,32 МЕ	1,19 МЕ	0,03 мкг/мл	5,6 мкг/мл
<i>Lactobacillus sp.RS6</i>	0,32 МЕ	1,77 МЕ	0,03 мкг/мл	9,2 мкг/мл

МЕ – международные единицы (1МЕ витамина А соответствует 0,344мкг кристаллического ретинил ацетата).

4. Силосование бобовых трав с интродукцией местных штаммов молочнокислых бактерий.

Ключевым этапом наших исследований явилось экспериментальное силосование растительной массы клевера и козлятника в полупроизводственных условиях с интродукцией четырех штаммов молочнокислых бактерий. Из выделенных лактобацилл два штамма (*Lactobacillus sp. RS3* и *Lactobacillus sp. RS4*) отобраны по от-

носителем более высокому кислотообразованию (табл.1) в ходе сбраживания растительного сока, в сочетании с высокой осмотолерантностью (табл.2) и умеренной протеолитической активностью (табл.3). Коллекционный штамм *L. plantarum* BS933 и коммерческий штамм *St.faecium* 500 взяты для сравнения как рекомендованные для консервирования зеленого сырья (Лаптев и др., 1992; Бондарев, 2001).

В качестве испытуемых бобовых растений были выбраны: клевер – традиционная для Татарстана кормовая культура и перспективная многолетняя трава – козлятник восточный.

Опытное силосование с интродукцией вышеуказанных штаммов молочнокислых бактерий включало предварительную подготовку и инокуляцию растительной массы, как указано в разделе Материалы и методы. Силосуемую массу закладывали в стерильные полиэтиленовые пакеты (в трехкратной повторности), помещали в силосный бург и утрамбовывали. Тем самым достигалось создание неблагоприятных условий для облигатно и факультативно аэробных микроорганизмов (с учетом бродильного типа энергетики молочнокислых бактерий).

Известно, что в процессе силосования участвует сообщество, включающее две группы микроорганизмов, различающихся по характеру воздействия на растительный материал (McDonald et al., 1991). Одна из них (молочнокислые бактерии и дрожжи) активно сбраживает растворимые углеводы, другая (в основном гнилостные бактерии) метаболизирует азотсодержащие, в том числе белковые вещества. Характер их взаимоотношений варьирует от симбиотических до антагонистических, в зависимости от природы сбраживаемого материала, воздушного и температурного режимов и других условий.

Численность и соотношение молочнокислой и сопутствующей микрофлоры исходной и силосуемой растительной массы относятся к решающим факторам, определяющим ход бродильных процессов. Поэтому микробиологический мониторинг брожения включал определение, наряду с содержанием молочнокислых бактерий и динамики аэробных гетеротрофов, аммонификаторов и дрожжей.

Что касается интродуцированных бактерий, то их дифференцированный учет в силосуемой массе проведен с использованием rif – мутантов (МКБ–rif). В применение подобной маркировки – часто употребляемый подход при оценке судьбы интродуцированных микроорганизмов. Для подобной цели используются, например, маркеры резистентности к рифампицину и стрептомицину, поскольку гены устойчивости к этим антибиотикам редко встречаются у молочнокислых бактерий (Tompson et al., 1997). По мнению Льюин (1987), введение маркера устойчивости к рифампицину – пример деликатного подхода, поскольку поведение rif-мутанта в физиологическом плане не отличается от исходного штамма.

На протяжении 45 суток силосования наблюдались характерные циклы подъема численности молочнокислых бактерий с максимумом на третьи и / или десятые сутки на уровне 300 – 500 млн КОЕ в вариантах с инокуляцией лактобациллами и 200 млн КОЕ в варианте со *Streptococcus faecium* 500 и в контроле (рис.5,6).

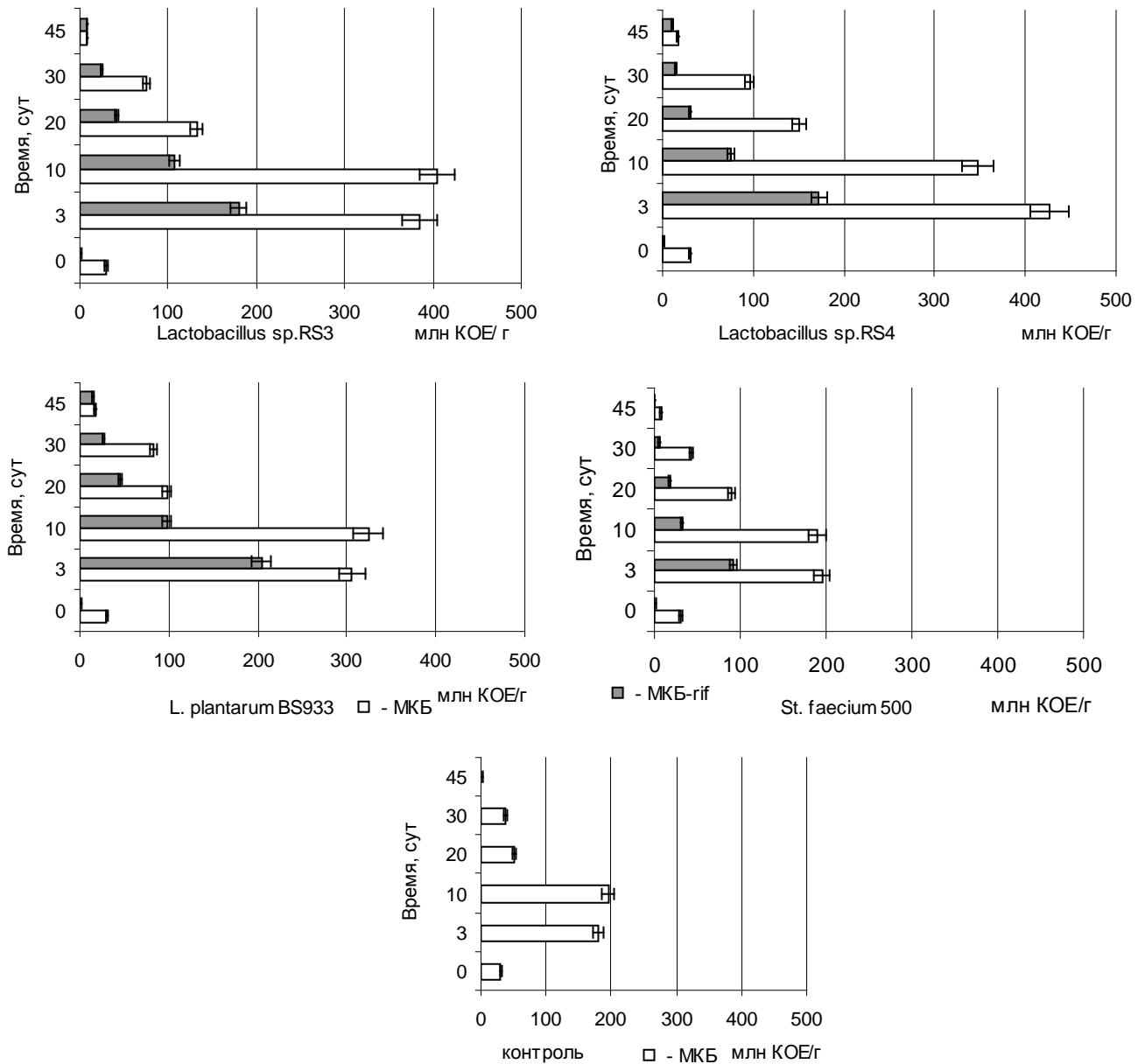
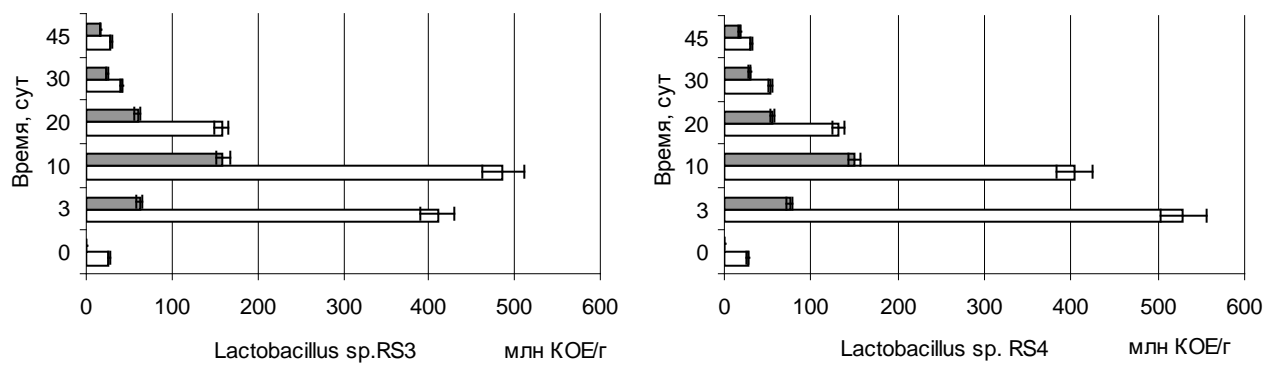


Рис.5. Динамика численности МКБ (сумма спонтанной и интродуцированной молочнокислой микрофлоры) и интродуцированных МКБ–rif штаммов в процессе силосования клевера.



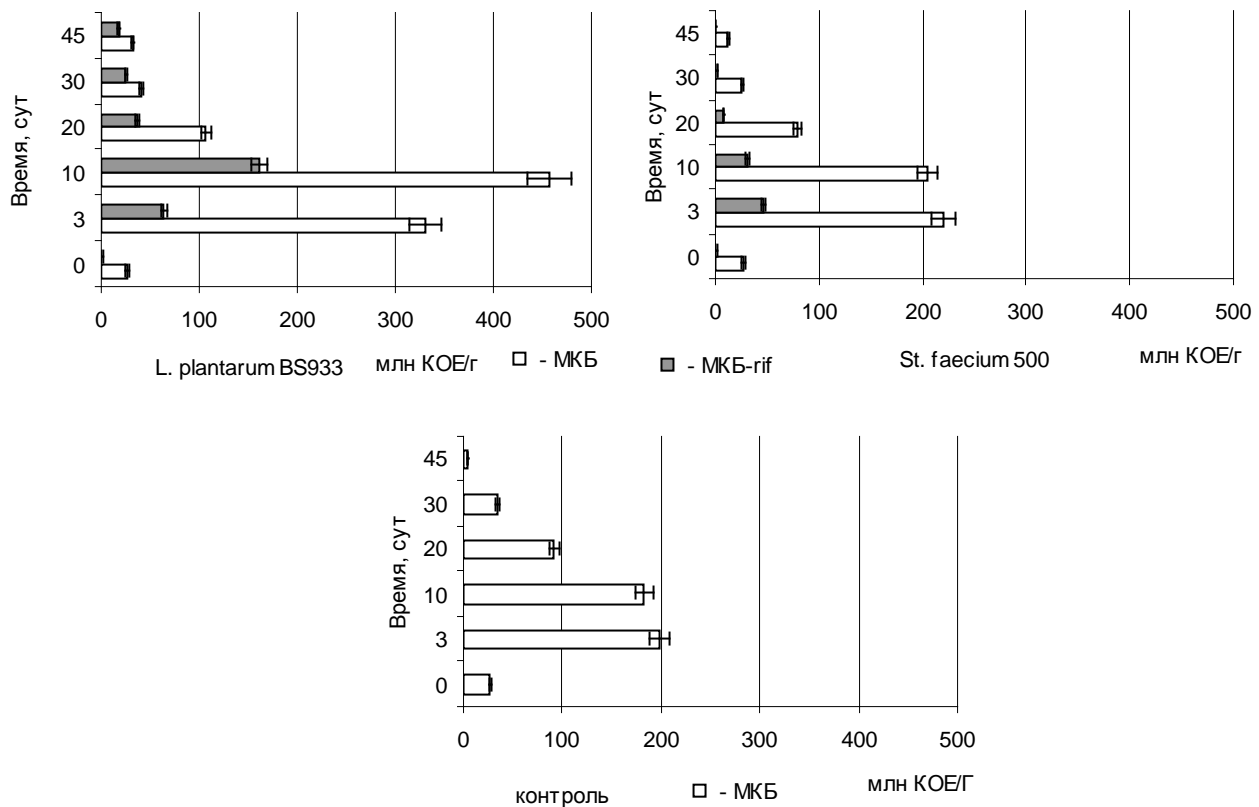


Рис.6. Динамика численности МКБ (сумма спонтанной и интродуцированной молочнокислой микрофлоры) и интродуцированных МКБ-rif штаммов в процессе силосования козлятника.

О конкурентоспособности интродуцированных бактерий из рода *Lactobacillus* на фоне спонтанной молочнокислой, а также сопутствующей микрофлоры свидетельствует их количественная динамика в силосуемой массе, где они в период активного роста составляли от 40 до 64% от общей суммы молочнокислых бактерий. В силосе же эта величина достигала 95%, что свидетельствует о радикальном изменении популяционной структуры молочнокислых бактерий в готовом корме. Хотя молочнокислые стрептококки физиологически близки к роду *Lactobacillus*, но их отличает, главным образом, меньшая активность роста и относительно низкая кислототолерантность (Квасников и др., 1975). По-видимому, это объясняет низкую концентрацию кокковых форм молочнокислых бактерий в ходе брожения и в готовом силосе.

Что касается структуры сопутствующей микрофлоры и ее динамики, то общей является тенденция к сокращению численности микроорганизмов к концу процесса силосования. Эта тенденция наиболее характерна для аэробных гетеротрофов и наименее выражена у аммонификаторов. Вместе с тем, абсолютная численность аммонификаторов находилась на самом низком уровне. Обращает на себя внимание специфическая динамика дрожжевой флоры при силосовании козлятника: резкий подъем (как в случае молочнокислых бактерий) в первые 10 дней силосования, а затем спад ко времени его завершения. Такая картина согласуется с известной кислототолерантностью многих дрожжей, сопоставимой с таковой молочнокислых бактерий (McDonald et al., 1991).

Рассмотренная выше картина эволюции микробного сообщества в ходе силосования находит отражение в динамике рН (рис.7). Скорость нарастания кислотности и достижение оптимума рН для эффективной консервации корма были сопоставимы с показателями традиционной схемы силосования. В литературе отмечается (Спесивцева и др., 1975), что растительная масса после стадии измельчения и провяливания имеет, как правило, рН 5,5–6,5, а хорошо сохранившегося силоса – около 4,3. В нашем эксперименте на третьей сут ферментации клевера и козлятника (рис.7) отмечено резкое снижение рН от начального уровня 6,1: в вариантах с *Lactobacillus sp. RS3* до 4,8 – 5,0, с *Lactobacillus sp. RS4* до 4,8 – 5,0, с *L. plantarum BS933* до 4,9 – 5,0, с *St. faecium 500* до 5,3 и в контроле до 5,4 – 5,5. Сравнительная динамика рН свидетельствует о том, что интродукция активных штаммов не только усиливает, но и ускоряет подкисление зеленой массы, что особенно важно для предотвращения роста гнилостных бактерий и других сопутствующих микроорганизмов. Это отмечено и в процессе экспериментального силосования смеси злаковых трав с люцерной и клевером (Победнов и др., 1997).

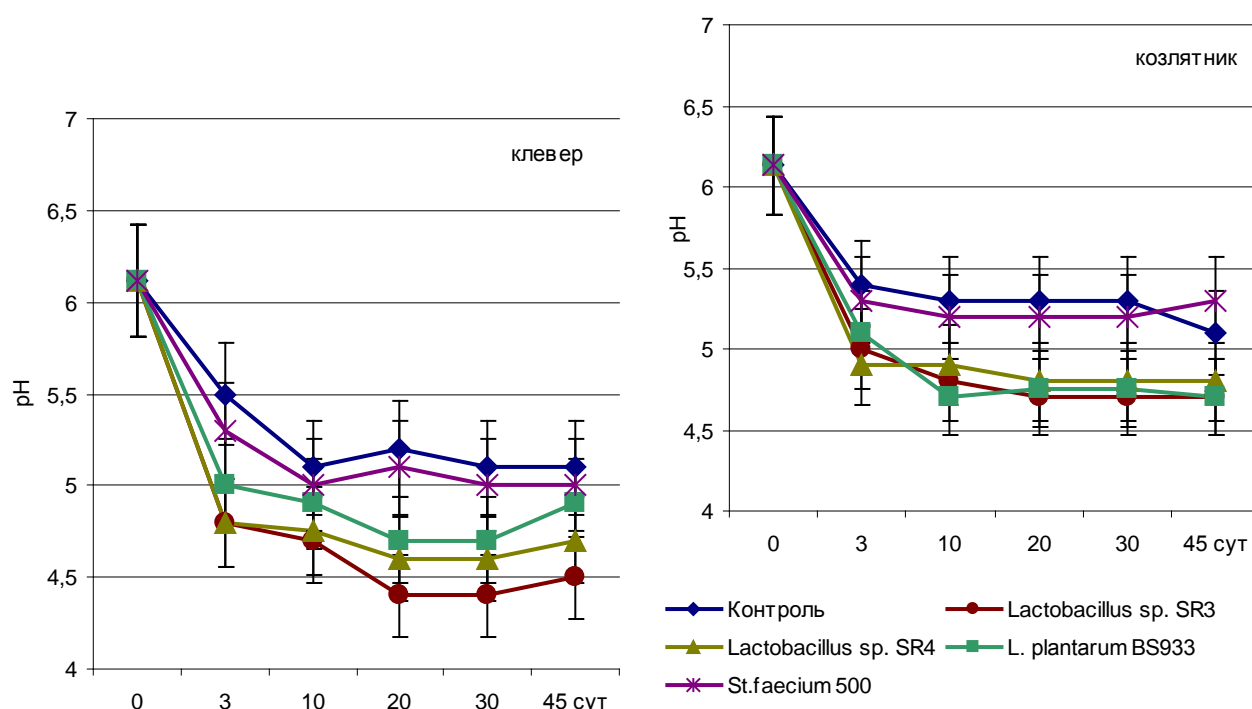
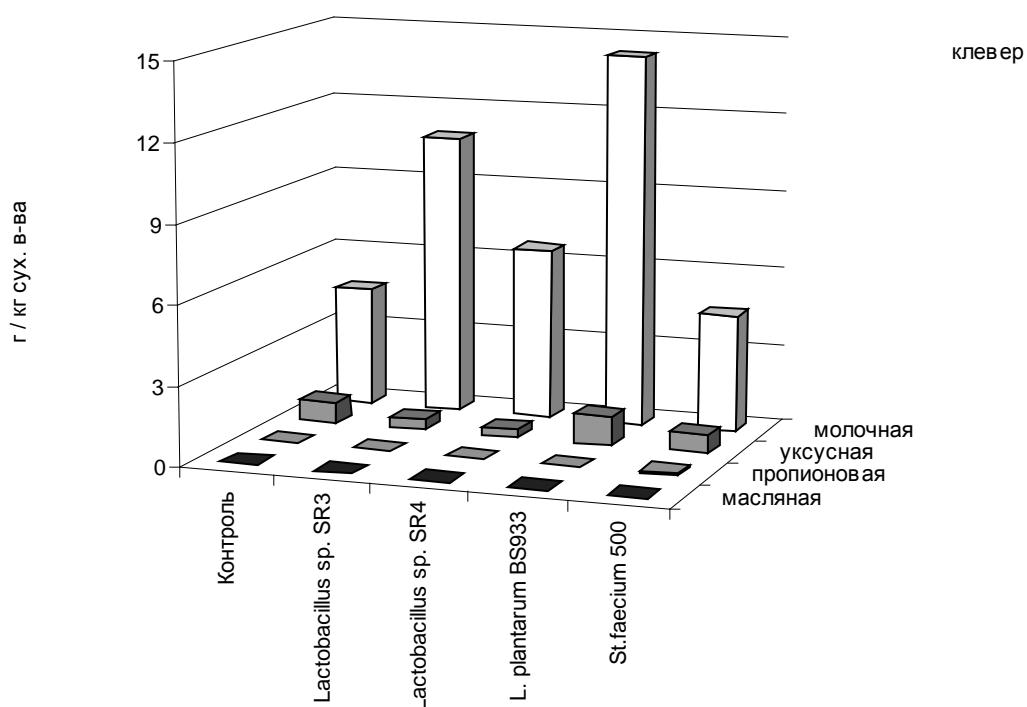


Рис.7. Динамика рН в процессе силосования бобовых культур.

Более активная продукция молочной кислоты экспериментальными штаммами по сравнению со спонтанной микрофлорой подтверждена непосредственным ВЭЖХ-анализом органических кислот. Очевидно, интродуцируемые микроорганизмы более рационально используют то количество легкодоступных форм углеводов, которые присутствуют в данном высокобелковом сырье, с преимущественным образованием молочной кислоты. В то же время в сбраживаемом субстрате не исключается образование уксусной кислоты и ее гомологов (пропионовой, масляной) происхождения которых, по-видимому, связано с жизнедеятельностью как гетероферментативных молочнокислых бактерий, так и иной спонтанной

микрофлоры, например, представителей родов *Pseudomonas*, *Clostridium* (Nadeau et al., 2000). В нашем эксперименте значения количества уксусной кислоты сопоставимы в вариантах с клевером и козлятником (рис.8). В структуре органических кислот в силосной массе козлятника несколько меньше доля молочной кислоты и больше уксусной, по сравнению с клевером, что возможно, связано с большей долей гетероферментативных молочнокислых бактерий в составе его спонтанной микрофлоры.

Если умеренное содержание уксусной кислоты является одним из показателей хорошего качества силоса, то пропионовая и особенно масляная кислоты являются вторичными продуктами ферментации растительного сырья, которые ухудшают его органолептические и питательные свойства (Хохрин, 2002). При высокой кислотности сбраживаемого субстрата возможность образования данных кислот минимальна (рис.8).



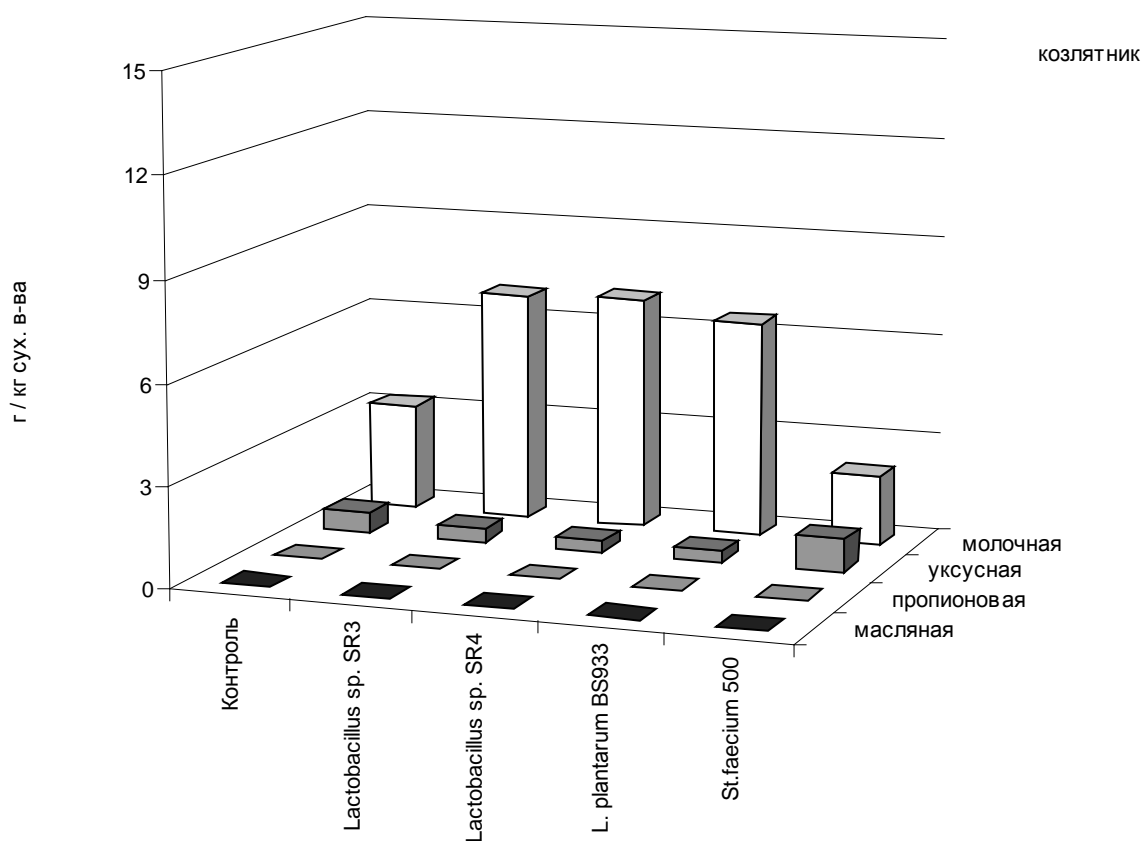


Рис.8. Концентрация органических кислот в силосной массе.

Наличие среднего уровня протеолитической активности у интродуцируемых штаммов не привело к усилению гидролиза белков в силосе, о чем свидетельствует сопоставимое содержание сырого протеина в корме контрольного и опытных вариантов (табл.5).

Содержание каротина, от которого в большой мере зависит ценность кормового продукта, в вариантах с интродукцией лактобацилл *Lactobacillus sp.RS3*, *Lactobacillus sp.RS4* и *L. plantarum BS933* на 10–40% превышало таковое в контроле. Этот феномен заслуживает дальнейшего изучения.

Таблица 5.

Основные показатели качества силосованного корма (в расчете на сухое вещество)

Варианты	Сырой протеин, %	Обменная энергия, МДж	Сахар, %	Каротин, мг/кг
клевер луговой				
контроль	17,0±0,4	9,3±1,1	3,4±0,7	52,1±5,7
<i>Lactobacillus sp. RS3</i>	17,4±0,5	9,3±1,0	3,8±0,5	71,4±6,0
<i>Lactobacillus sp. RS4</i>	17,2±0,4	9,3±1,1	4,1±0,4	70,5±6,1
<i>L. plantarum BS933</i>	17,3±0,3	9,3±0,9	4,1±0,3	69,9±5,1
<i>St. faecium 500</i>	16,8±0,45	9,1±1,1	3,8±0,5	56,0±6,0

КОЗЛЯТНИК ВОСТОЧНЫЙ				
контроль	16,9±0,5	9,2±1,2	2,9±0,6	43,0±4,1
<i>Lactobacillus sp. RS3</i>	16,9±0,6	9,4±0,8	3,0±0,7	48,5±4,0
<i>Lactobacillus sp. RS4</i>	17,0±0,3	9,4±1,0	3,2±0,65	44,6±4,2
<i>L. plantarum BS933</i>	17,0±0,5	9,4±1,1	2,8±0,5	46,6±4,1
<i>St.faecium 500</i>	16,6±0,4	9,1±1,0	2,4±0,6	36,2±4,2

Потенциальная возможность увеличения образования витамина А, в частности при низкотемпературном брожении отмечена ранее Уотсон с соавторами (1964). Эта особенность была отмечена нами еще на уровне сбраживания растительных соков, о чем говорилось выше.

Обращает на себя внимание также на 20–70% более высокий уровень витамина Е после сбраживания соков в вариантах с интродуцированными штаммами (табл.4).

О важном эффекте направленной инокуляции свидетельствует и сопоставление органолептических свойств полученных кормов. Если при вскрытии пакетов в вариантах с инокуляцией клевера и козлятника штаммом *St. faecium 500* отмечено потемнение силоса и появление запаха прогорклого масла, то в вариантах с *Lactobacillus sp. RS3*, *Lactobacillus sp. RS4* и *L. plantarum BS933* высокое качество корма подтверждается его светлозеленым (оливковым) цветом и приятным силосным запахом.

ВЫВОДЫ

1. Молочнокислые бактерии не относятся к числу мажорных групп микроорганизмов в фило– и ризосфере бобовых растений (клевера лугового, козлятника восточного и люцерны посевной), культивируемых на серых лесных почвах Татарстана. При этом их численность в ризосфере низка (на уровне $10^3 - 10^4$ КОЕ/г) по сравнению с их количеством в составе эпифитной микрофлоры, где содержание молочнокислых бактерий почти на два порядка больше. В то же время количество ризосферных молочнокислых бактерий на порядок выше, чем в почве в отсутствие растений.
2. Из фило– и ризосферы районированных сортов бобовых растений в селективных условиях выделены молочнокислые бактерии из рода *Lactobacillus*, обладающие повышенной способностью к продукции молочной кислоты и скоростью кислотообразования, умеренной протеолитической активностью и устойчивостью к повышенному осмотическому напряжению среды.
3. По данным мониторинга микробиологических и биохимических показателей в условиях моделирования молочнокислого сбраживания растительных соков наибольшую активность при брожении клеверного сока проявили местные штаммы *Lactobacillus sp. RS1*, *Lactobacillus sp. RS2*, *Lactobacillus sp. RS3*, *Lactobacillus sp. RS4* и коллекционный штамм *L. plantarum BS933*, а в случае для сока козлятника – *Lactobacillus sp. RS2*, *Lactobacillus sp. RS3*, *Lactobacillus sp. RS4*, *L. plantarum BS933*.

4. С интродукцией молочнокислых бактерий, отобранных по совокупности технологически важных свойств, в опытных условиях осуществлено силосование высокобелковых бобовых растений (клевера лугового и козлятника восточного). Полученные данные свидетельствуют о том, что по ключевым критериям (скорости и масштабам ацидогенеза, соотношению молочной кислоты и гомологов жирных кислот, популяционной структуре и динамике микрофлоры) интродукция с использованием местных штаммов гомоферментативных молочнокислых бактерий *Lactobacillus sp. RS3* и *Lactobacillus sp. RS4*, а также коллекционного штамма *Lactobacillus plantarum BS933* способствует активизации процесса силосования.
5. Уровни содержания белковых компонентов и остаточных сахаров, высокая кислотность, характер микробиоценоза, а также повышенное содержание каротина в силосах на основе клевера лугового и козлятника восточного, полученных с интродукцией активных местных штаммов молочнокислых бактерий, свидетельствуют о высоких кормовых качествах полученного продукта.
6. Разработана эффективная схема создания банка активных местных штаммов молочнокислых бактерий для силосования, включающая их выделение из фило- и ризосферы растений, лабораторное моделирование молочнокислого сбраживания соков конкретных растений и экспериментальное силосование растительной массы в полупроизводственных условиях.

РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шурхно Р.А. Микробиологическая активность почвы в ризосфере различных сортов клевера лугового и люцерны / Р.А. Шурхно, Р.Г. Гареев, Ш.К. Шакиров, О.Л. Шайтанов, Н.Л. Мугинов, Р.П. Наумова // Нива Татарстана. – 2000. – №5–6. – С. 28–29.
2. Шурхно Р.А. Сравнительное изучение средообразующей активности различных сортов клевера / Р.А. Шурхно, Р.Г. Гареев, О.Л. Шайтанов, Н.Л. Мугинов, Р.П. Наумова // Кормопроизводство. – 2001. – №2. – С. 17–18.
3. Шурхно Р.А. Развитие микробных ассоциаций в процессе силосования многолетних бобовых культур с интродукцией штаммов молочнокислых бактерий / Р.А. Шурхно, Э.З. Харисова, Ш.З. Валидов, Ш. К. Шакиров, Р.Г. Гареев, А.М. Боронин, Р.П. Наумова // Нива Татарстана. – 2001. – №6. – С. 23–28.
4. Шурхно Р.А. Микробиология силосования бобовых культур с интродукцией молочнокислых бактерий / Р.А. Шурхно, Э.З. Харисова, Ш.З. Валидов, Ш. К. Шакиров, Р.Г. Гареев // Деп. В ВИНТИ 12.10.01. – №2155–В2001. – 20с.
5. Шурхно Р.А. Выделение молочнокислых бактерий из различных источников / Р.А. Шурхно, Э.З. Харисова, Ш.З. Валидов, Р.Г. Гареев, А.М. Боронин // Деп. В ВИНТИ 25.01.02. – №143–В2002. – 28с.
6. Шурхно Р.А. Моделирование силосования бобовых растений с интродукцией молочнокислых бактерий / Р.А. Шурхно, Э.З. Харисова, Ш.З. Валидов // Сборник тезисов 5^{ой} Пущинской конференции молодых ученых «Биология – наука 21^{го} века», 16–20 апреля 2001. – С.317.
7. Шурхно Р.А. Микробиология силосования многолетних бобовых трав с внесением различных штаммов молочнокислых бактерий / Р.А. Шурхно, Э.З. Харисова,

Р.Г. Гареев, Ш.К. Шакиров, Ш.З. Валидов, А.М. Боронин, Р.П. Наумова // Тезисы докл. всерос. науч.-практ. конф. «Агроэкологические проблемы сельскохозяйственного производства в условиях техногенного загрязнения агроэкосистем». – Казань, 2001.

8. Шурхно Р.А. Отбор штаммов молочнокислых бактерий и их интродукция в растительную массу / Р.А. Шурхно, Ш.К. Шакиров, Р.Г. Гареев // Материалы отчетной сессии молодых ученых ТатНИИСХ. – Казань, 2003. –

С. 203–212.

9. Шурхно Р.А. Оценка микробного статуса ризосферы многолетних бобовых трав / Р.А. Шурхно, О.Л. Шайтанов, Р.Г. Гареев // Труды Международной конференции «Роль почвы в формировании естественных и антропогенных ландшафтов», посвященной 75-летию кафедры почвоведения Казанского Государственного Университета. Казань, 2003. – С.512–517.

10. Шурхно Р.А. Оценка устойчивости микробных сообществ в прикорневой зоне кормовых бобовых трав / Р.А. Шурхно, Е.С. Норина, О.Л. Шайтанов, Р.Г. Гареев // Нива Татарстана. – 2003. – №5–6. – С. 34–40.

11. Шайтанов О.Л. Влияние сортов клевера лугового на плодородие серых лесных почв Республики Татарстана / О.Л. Шайтанов, Р.А. Шурхно // Кормопроизводство. – 2004. – №3. – С. 19–20.

12. Шурхно Р.А. Оценка устойчивости микробных сообществ в прикорневой зоне кормовых бобовых трав / Р.А. Шурхно, Е.С. Норина, О.Л. Шайтанов, Р.Г. Гареев // Сборник тезисов 8^{ой} Пушинской конференции молодых ученых «Биология – наука 21^{го} века», май 2004.

13. Шурхно Р.А. Микробиологический статус микрофлоры ризосферы многолетних бобовых трав как критерий оценки и прогноза состояния почвы / Р.А. Шурхно, О.Л. Шайтанов, Р.Г. Гареев, Р.П. Наумова // Сельскохозяйственная биология. – 2004. – №3. – С.61–66.

14. Шурхно Р.А. Ферментация высокобелковой растительной массы с интродукцией молочнокислых бактерий / Р.А. Шурхно, Р.Г. Гареев, А.Г. Абульханов, Ш.З. Валидов, А.М. Боронин, Р.П. Наумова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т.40 (в печати).